

Device for culturing cells which ensures their immobilisation**Publication number:** FR2659347**Publication date:** 1991-09-13**Inventor:** JEAN-PIERRE OZIL**Applicant:** AGRONOMIQUE INST NAT RECH (FR); ELF
AQUITAINE (FR)**Classification:**- **international:** C12N13/00; C12N13/00; (IPC1-7): C12M3/10- **european:** C12N13/00**Application number:** FR19900003108 19900312**Priority number(s):** FR19900003108 19900312**Report a data error here****Abstract of FR2659347**

The present invention relates to a cell culture device consisting of a chamber comprising a fluid inlet and a fluid outlet, characterised in that one or more orifices, whose geometry is such that it prevents the passage of cells, exist at the lower part of the chamber, and in that the fluid entering into the chamber is removed at least partially, through the orifices, creating a depression such that it substantially brings about the blocking of the cells upon the orifice(s), a portion of the fluid being evacuated by overflow. This device may comprise, in addition, electrodes on the inner wall of the chamber. The present invention also relates to a process for the artificial stimulation of cells using this device.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 659 347

(21) N° d'enregistrement national :

90 03108

(51) Int Cl^s : C 12 M 3/10

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 12.03.90.

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE — FR et SOCIETE
NATIONALE ELF AQUITAINE — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Ozil Jean-Pierre.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 13.09.91 Bulletin 91/37.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.

(54) Dispositif de culture de cellules assurant leur immobilisation.

(57) La présente invention concerne un dispositif de culture
de cellules constitué d'une enceinte comportant une arri-
vée de fluide et une sortie de fluide, caractérisée en ce qu'à
la partie inférieure de l'enceinte, se trouvent un ou plu-
sieurs orifices dont la géométrie est telle qu'elle s'oppose
au passage des cellules et en ce que le fluide entrant dans
l'enceinte est prélevé, au moins en partie, à travers les ori-
fices, en créant une dépression telle qu'elle assure sensi-
blement le blocage des cellules sur le ou les orifices, une
partie du fluide étant évacuée par débordement.

Ce dispositif peut comporter en outre des électrodes sur
la paroi interne de l'enceinte.

La présente invention se rapporte également à un pro-
cédé de stimulation artificielle de cellules utilisant ce dispo-
sитif.

FR 2 659 347 - A1



La présente invention concerne un dispositif de culture de cellules assurant leur immobilisation, permettant leur traitement par différents milieux en évitant leur manipulation, et un procédé de stimulation de ces cellules utilisant ce dispositif.

5 La présente invention se rapporte également à la stimulation de cellules, en particulier d'ovocytes ou d'oeufs fécondés, par un mécanisme biochimique régulé dans les conditions physiologiques par un oscillateur interne.

10 Elle se rapporte donc à la procédure de clonage des embryons d'animaux et, en particulier à l'obtention d'ovocytes receveurs compétents pour la greffe d'un noyau cellulaire dans un état homogène.

15 Le clonage d'embryons d'animaux domestiques est la voie permettant de remédier à la variabilité génétique induite par la fécondation et de standardiser les améliorations génétiques d'une race.

15 Lors de la fécondation, l'entrée du spermatozoïde va avoir deux grandes fonctions :

- apport du génome haploïde mâle,
- activation du développement qui restructure le noyau mâle par le cytoplasme de l'ovocyte et favorise les interactions noyau-cytoplasme.

20 Il s'écoule en moyenne 12 à 20 heures entre la fécondation et la première division cellulaire, pendant lesquelles un ensemble de phénomènes ont lieu, les deux génomes paternel et maternel ayant des rôles complémentaires pour un développement ultérieur de l'embryon (Surani et al. 1984, Nature 308, 548-550), mais on n'en connaît pas le 25 mécanisme exact.

30 Le clonage d'un embryon est une méthode qui vise à obtenir le plus d'animaux vivants à la suite du transfert des noyaux cellulaires de cet embryon (qui contient plusieurs cellules) dans des ovocytes enucleés et activés. Les deux fonctions de la fécondation sont dissociées. Afin d'obtenir un développement ultérieur de l'oeuf, il faut procéder à une activation de l'ovocyte receveur avant la greffe nucléaire. L'activation peut aussi s'appliquer aux premières heures du développement de l'oeuf fécondé.

On sait que les oeufs de mammifères peuvent être activés artificiellement par différents stimuli physiques ou chimiques, qu'il s'agisse

de chocs électriques, thermiques ou osmotiques, d'enzymes ou d'agents anesthésiques (Kaufman MH 1983 - Early mammalian development - parthenogenetic studies - Cambridge University Press). Cependant, l'activation est toujours identifiée à un stimulus unique, limité dans le temps, supposé mimer la pénétration du spermatozoïde dans l'oeuf. Aucun de ces traitements ne reproduit la série de changements physiologiques se produisant dans l'oeuf après la pénétration du spermatozoïde.

On ne connaît que quelques cas d'activation parthénogénétique de l'ovocyte de vache (Menezo et al. 1976 - Commission of the European Communities, Agricultural research seminar, Egg transfer in Cattle. Eur 5491) ; aucune méthode vraiment fiable et précise d'activation des ovocytes de bovins n'est disponible. L'activation expérimentale par l'éthanol présente de nombreux inconvénients : grande variabilité des résultats en fonction de l'âge des ovocytes (Cuthbertson, 1983 ; J. Exp. Zool. 226, 311-314).

En ce qui concerne le clonage d'embryons, les premiers résultats incontestés ont été obtenus par S. Willadsen en 1986 chez la brebis. Ils ont été suivis par ceux de Prather et al en 1987 chez la vache, et en 1989 chez la truie. Chez la lapine, les premiers individus issus de clonage ont été obtenus par Stice et Robl en 1988. Les taux de succès de ces expériences rapportés dans les publications ne dépassent généralement pas 4 %. Toutefois, des sociétés américaines (Granada Genetics, Houston, Texas) ou Canadienne (Alta Genetics, Callgary, Alberta), semblent maîtriser la procédure de clonage chez les bovins. Il est dit qu'une centaine de veaux aurait déjà été obtenue sur le continent nord-américain. Cette prise en main industrielle reflète l'intérêt que suscite le clonage d'embryon chez les bovins. Mais les techniques ont-elles vraiment progressé ?

Les procédures décrites dans les publications se ressemblent. Les ovocytes utilisés ont subi une période de vieillissement de 6 à 10 heures. Ce vieillissement est rendu nécessaire pour favoriser l'activation (aucune technique classique d'activation ne permet d'activer des ovocytes fraîchement ovulés même chez les bovins (Ware et al. 1989). Les chromosomes organisés sur la métaphase II sont prélevés en "aveugle" dans

la région du premier globule polaire, mais des techniques de visualisation des chromosomes par fluorescence sont mises en oeuvre. Une cellule embryonnaire provenant d'une morula est introduite sous la zone pellucide et la fusion est obtenue par des impulsions de champs électriques.

5 L'activation de l'ovocyte est généralement provoquée par la procédure de fusion cellulaire ; dans certains cas, elle n'est pas décrite. Deux chercheurs ont pu obtenir un agneau à la suite du transfert dans un ovocyte d'un noyau provenant d'une cellule du bouton embryonnaire (Smith & Wilmut, 1989).

10 Toutefois, le niveau des résultats et la complexité des mécanismes en jeu tels que le stade de différenciation du noyau, la phase du cycle cellulaire, l'état de l'ovocyte receveur, son âge, la procédure d'activation ne permettent pas de comprendre pourquoi certains embryons se développent et d'autres non. De nombreuses théories pour expliquer les échecs comme celle fondée sur l'activité de transcription du noyau transplanté ont été contredites par quelques résultats expérimentaux.

15 Des données nouvelles sont apparues sur les mécanismes physiologiques déclenchés par la fécondation et notamment en ce qui concerne les rythmes des variations de niveau du calcium libre et des seconds messagers comme l'Inositol (1,6,5)-tri-phosphate (InsP3) (Cuthbertson et al. 1981 ; Cuthbertson & Cobbold, 1985 ; Miyazaki et al. 1986 ; Miyazaki, 1988). L'activité périodique de ces seconds messagers pourrait réguler les synthèses des acides nucléiques (ADN et ARNs) et des protéines (Basset et al. 1968 ; Rodan et al. 1978).

20 Le processus est déclenché par le spermatozoïde dans les secondes qui suivent la fécondation. La chaîne de réactions qui aboutit à la production d'InsP3 semble dépendre d'un influx d'ions calcium. L'InsP3 se lie à un récepteur spécifique qui contrôle l'activité d'un canal calcique situé sur la membrane intracellulaire d'un réservoir intracellulaire de calcium. Le calcium ainsi libéré active des protéines spécifiques, qui elles-mêmes activent des processus spécifiques, par exemple la complexation calcium-calmoduline, l'activation de kinase etc. Le calcium est considéré comme l'activateur principal du métabolisme. Ce cycle de réactions se reproduit à

une fréquence de l'ordre de la minute durant plusieurs heures (McCulloh et al. 1983 ; Igusa & Miyazaki, 1983-1986 ; Miyazaki et al. 1986 ; Miyazaki, 1988).

5 Cette activité rythmique, due à un système de signaux intracellulaires émis à une fréquence propre, semble dépendre de la présence de pronuclei mâle et femelle car elle n'a pu être observée sur des oeufs parthénogénétiques activés par des méthodes classiques (Cuthbertson et al. 1981 ; Cuthbertson & cobbold, 1985 ; Miyazaki, 1988).

10 L'injection dans des ovocytes d'une protéine G (guanosine -5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP [S]) induit plusieurs cycles de libération de calcium, mais ne permet pas de maintenir cette activité au-delà du quatrième (Swann, Igusa & Miyazaki, 1989).

15 Les contributions génétiques respectives de l'ovocyte et du spermatozoïde sont très documentées chez la souris. Ces études montrent que le développement normal à terme d'un embryon dépend de la présence permanente durant tout le premier cycle cellulaire des deux pronuclei parentaux (PN) (Surani & Barton 1983 ; McGrath & Solter, 1984 ; Surani et al. 1986 ; Mann & Lovell - Badge, 1986, 1988).

20 La production de jeunes par clonage ne peut être réalisée dans la pratique que si l'on dispose de procédés fiables et reproductibles. La qualité de l'activation de l'oeuf joue dans le développement un rôle important jusque là ignoré.

25 La maîtrise de l'activation comprise comme phénomène rythmique s'étendant sur tout le premier cycle cellulaire est essentielle, non seulement pour produire en routine des ovocytes activés et synchrones mais aussi pour faire bénéficier des oeufs "clonés" de ce type d'activation imposée pour se développer normalement.

30 La présente invention concerne donc un procédé de stimulation artificiel à long terme d'un ensemble de cellules reproduisant l'effet d'un mécanisme de régulation biochimique, contrôlé dans les conditions physiologiques naturelles par un oscillateur interne, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) les cellules sont placées en culture in vitro, pendant un temps déterminé,
- b) on effectue un lavage des cellules par le milieu d'impulsion,
- c) les cellules sont placées dans le milieu d'impulsion,
- 5 d) on soumet les cellules à une impulsion générée par un champ électrique,
- e) les cellules sont à nouveau placées dans le milieu de culture,
- f) on répète les étapes précédentes un certain nombre de fois, et
- g) on obtient les cellules dans un état activé homogène.

10 Ce procédé de stimulation bien qu'il puisse être utilisé dans un grand nombre de procédé, a été mis au point dans le cadre de l'activation des ovocytes en vue du clonage d'embryons. Des études récentes ont en effet montré que dans les oeufs de mammifères, la fécondation est accompagnée d'une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire de calcium libre ($[Ca^{2+}]_i$), suivie d'une série d'oscillations de cette 15 concentration, qui dure au moins 4 heures.

On ignore encore par quel moyen le spermatozoïde déclenche ces variations de $[Ca^{2+}]_i$, ainsi que les fonctions biologiques exactes de ces oscillations de Ca^{2+} de longue durée. Cependant, elles semblent caractéristiques des oeufs fécondés et n'ont jamais été observées quand les 20 ovocytes sont artificiellement activés (Miyazaki 1988 - J. Cell. Biol. 106, 345-353).

Le procédé développé dans la présente invention va donc permettre de stimuler périodiquement les ovocytes par des influx de calcium au niveau de la membrane plasmique.

25 En effet, en introduisant dans le milieu d'impulsion des ions Ca^{2+} , ceux-ci vont pouvoir pénétrer dans la cellule par l'électroporation, c'est-à-dire la création de "pores" générés par l'impulsion électrique.

Au-delà des phénomènes immédiats provoqués dans l'ovocyte comme l'expulsion du globule polaire, les effets de cette stimulation se 30 manifesteront sur les stades ultérieurs du développement de l'embryon, alors même que le traitement a cessé. C'est ainsi que les phénomènes de compaction et de cavitation pourront être affectés.

Ce procédé peut s'appliquer aux ovocytes fraîchement ovulés, obtenus par stimulation hormonale de la femelle. L'activation des ovocytes dans les conditions définies de fréquence, d'intensité et de durée provoque l'expulsion du deuxième globule polaire. On peut alors prélever les 5 chromosomes qui se trouvent en fin de télophase juste sous le deuxième globule polaire. On dispose d'ovocytes dans le même état physiologique possédant un pronucleus.

On introduit alors un blastomère sous la zone pellucide et on procède à la fusion cellulaire par action d'un champ électrique.

10 Le procédé peut alors s'appliquer aux embryons clonés ainsi obtenus, afin d'améliorer leur développement, c'est-à-dire de régulariser les divisions cellulaires et d'obtenir la compaction.

15 La stimulation par ce procédé peut s'appliquer à des ovocytes fraîchement ovulés placés en présence de cytochalasine B, qui inhibe l'expulsion du deuxième globule polaire, maintenant un état diploïde. On obtient ainsi une population d'embryons parthenogénétiques, qui pourront être implantés dans des femelles receveuses et présenteront un développement synchrone du foetus et des annexes embryonnaires.

20 Ces expériences d'abord menées sur des ovocytes de lapine ont été confirmées sur des ovocytes de souris, réputés réfractaires à l'activation juste après l'ovulation. Les performances du procédé sont donc reproducibles d'une espèce à l'autre. La méthode d'activation pourra certainement s'appliquer à des ovocytes fraîchement ovulés de bovin ou d'ovin.

25 Si l'on soustrait les ovocytes en cours de traitement, ils régressent et on obtient certains artefacts, comme des ovocytes en métaphase III reproductibles à volonté, et qui offrent de nouvelles possibilités d'études, notamment sur la dynamique du cytosquelette et l'activation du génome.

30 Le procédé a été conçu sur la base des effets des champs électriques sur les membranes plasmiques.

Il a été montré (Zimmermann, 1982) que des impulsions de champs électriques de l'ordre de 1 à 3 kVcm⁻¹ et d'une durée de quelques µs peuvent créer des micropores dans la membrane plasmique et établir une

communication directe entre les milieux intra et extra cellulaire. Il a été ainsi possible par exemple de faire pénétrer du calcium dans des ovocytes d'oursin en les exposant à des impulsions de champs électriques en présence d'ions calcium (Rossignol et al 1983). L'amplitude de ces influx peut être modulée par la durée de l'impulsion de champ électrique.

Le procédé implique la conjugaison d'une méthode de culture in vitro d'un lot d'ovocytes (ou embryons) par perfusion entre deux électrodes et d'une méthode de lavage avec une solution non conductrice contenant du calcium 0 à 20 µM dans laquelle sont délivrées les impulsions. La présence d'une solution très faiblement conductrice au moment d'une impulsion permet de faire apparaître un champ électrique entre les électrodes. Une présence excessive d'ions diminue l'effet "champ électrique".

L'alternance d'une période de culture et d'une période de lavage permet de soumettre fréquemment les ovocytes à des stimulations dans un milieu ionique très bien défini.

Ce procédé peut s'étendre à la stimulation des cellules par toute une gamme de signaux simples ou complexes ioniques ou moléculaires à des concentrations variables qui seront déterminés par la composition du milieu d'impulsion.

Ce procédé permet de moduler la fréquence du signal par la durée entre deux lavages, et son amplitude par la durée de l'impulsion électrique.

Il est impératif de remplacer totalement le milieu de culture par la solution d'impulsion, car l'intensité du courant due à des excès d'ions provenant du milieu de culture détruirait les ovocytes. Juste après l'impulsion, la solution d'impulsion est remplacée par le milieu de culture, les ovocytes ne pouvant pas survivre dans la solution d'impulsion.

Ce procédé peut être piloté par l'intermédiaire d'un logiciel qui permettra de créer des traitement de stimulation selon des équations spécifiques, exponentielles, sinusoïdales, suites de Fourier ou autres.

L'un des aspects de la présente invention est le traitement simultané d'un ensemble d'ovocytes, qui seront ainsi obtenus, activés dans le même état physiologique. Les greffes de noyau pourront ainsi être réalisées sur des ovocytes physiologiquement identiques.

Lors du clonage, la séquence et les phases du cycle cellulaire durant lesquelles sont enchaînées les opérations ont des conséquences très importantes sur le remodelage des noyaux et sur le développement ultérieur.

5 Il est extrêmement intéressant de pouvoir standardiser les différentes phases du traitement des ovocytes, afin d'obtenir une bonne reproductibilité du procédé.

10 La présente invention concerne donc un système dynamique, fonctionnant en continu et pouvant être automatisé, réalisé par un dispositif permettant la succession automatique des étapes de lavage, de stimulation et l'acquisition des paramètres de stimulation.

15 Ce dispositif est caractérisé par le fait qu'il assure l'immobilisation des cellules pendant les différentes phases du traitement.

Il est constitué d'une enceinte comportant une arrivée de fluide et une sortie de fluide et, est caractérisé en ce qu'à la partie inférieure de l'enceinte se trouvent un ou plusieurs orifices dont la géométrie est telle qu'elle s'oppose au passage des cellules et en ce que le liquide entrant dans l'enceinte est prélevé, au moins en partie, à travers les orifices, en créant une dépression telle qu'elle assure sensiblement le blocage des cellules sur le ou les orifices, une partie du fluide étant évacuée par débordement.

20 Ce dispositif permet de retenir les cellules sans les abîmer ni introduire une contrainte mécanique parasite. En outre, il permet à tout moment de replacer, prélever ou déplacer des cellules. Ce dispositif permet donc de placer successivement les cellules dans des milieux de composition chimique de différentes natures, durant des périodes et selon une fréquence variables.

25 L'enceinte comporte de préférence sur ses parois internes deux électrodes parallèles, et les cellules sont alignées à égale distance des électrodes, baignant dans le milieu correspondant à la phase du traitement en cours.

Grâce à ce dispositif, on peut à volonté cultiver les cellules ou bien dans le milieu d'impulsion faire pénétrer dans la cellule traitée, un ion, une molécule, une substance chimique ou biologique complexe.

Ces milieux, aussi bien le milieu de culture que le milieu d'impulsion, sont en circulation continue, et c'est ce flux de liquide qui par effet de succion assure le maintien des ovocytes entre les électrodes pendant les renouvellements du milieu.

5 Les compositions des milieux de culture sont connues et dépendent des cellules en culture. Le milieu d'impulsion est généralement constitué d'un milieu non ionique pour assurer un effet de champ. Il s'agira d'une solution isotonique par exemple de glucose.

10 La présence d'une grande quantité d'ions peut gravement nuire aux cellules lors de l'impulsion. Il est donc nécessaire de laver les cellules avec le milieu d'impulsion pour éliminer les ions contenus dans le milieu de culture.

15 Ce dispositif peut être conçu comme une chambre d'activation, dont la capacité peut être adaptée au nombre de cellules que l'on souhaite traiter simultanément.

20 Les caractéristiques du procédé mettant en oeuvre le dispositif, peuvent varier largement et ne sont en général limitées que par des conditions telles que les durées de lavage. Ainsi, la fréquence des impulsions est limitée par la durée de lavage minimum par le milieu d'impulsion.

25 Les paramètres du procédé et du dispositif c'est-à-dire les arrivées et les sorties de fluide, de même que la fréquence, la durée et l'intensité des impulsions électriques arrivant dans les électrodes sont gérées par un système électronique.

Les caractéristiques des impulsions électriques en elles-mêmes peuvent varier et dépendre des cellules et des buts recherchés.

30 En général, les champs électriques varient de 1 à 3 Kv. cm⁻¹ et l'impulsion électrique a une durée de 10 µs à 2 000 µs.

L'organisation des tubulures qui débouchent dans la chambre permet d'injecter des milieux sans que les ovocytes soient décrochés par les bulles de gaz qui finissent par se former dans les canalisations. De plus, la structure de distribution des milieux permet de limiter considérablement la contamination ionique du milieu de stimulation par les ions du milieu de culture.

Les pompes d'injection des milieux peuvent être commandées par un microordinateur qui déterminera les séquences de lavage répétables tout en maintenant les cellules entre les électrodes.

5 Ce dispositif pourra s'appliquer au traitement des cellules par toute substance que l'on souhaite faire pénétrer dans l'espace intracellulaire. La composition du milieu d'impulsion déterminera la pénétration de cette substance selon un gradient de concentration.

10 Lors d'une culture cellulaire, on pourra provoquer, à un moment déterminé, qui peut être unique, l'entrée dans l'ensemble des cellules de la substance souhaitée. Pour cela on remplacera le milieu de culture par le milieu d'impulsion et on déclenchera l'impulsion de champ électrique, la durée de l'impulsion déterminant la quantité de substance qui pénètre. Ce milieu d'impulsion pourra alors être évacué et les cellules remises en culture dans un milieu approprié. L'avantage de ce système est 15 qu'il permet de traiter simultanément un ensemble de cellules qui sont ainsi synchronisées. Il fonctionne en continu et évite toute manipulation des cellules, assurant ainsi une meilleure reproductibilité et une plus grande rapidité d'exécution. Ceci permet une standardisation des conditions et facilite le transfert de technologies.

20 On peut envisager de faire pénétrer dans les cellules un ion ou une molécule simple. Ce dispositif peut aussi s'appliquer à la stimulation des cellules par une molécule plus complexe, ou à la pénétration de fragments d'ADN, ou d'épisome.

25 Ce dispositif sera utilisé pour réaliser une stimulation cyclique des cellules, plusieurs séquences de base étant réalisées successivement, l'intensité, la durée et la fréquence des impulsions pilotées par l'intermédiaire d'un microordinateur.

Ce dispositif permet la réalisation du procédé d'activation et de synchronisation d'ovocytes, par des stimulations répétées par Ca^{2+} , en vue du clonage d'embryons d'animaux domestiques.

5 Un mode de réalisation de la chambre est représenté en figure 1.

La figure 2 représente les courbes de durée des impulsions pour les différents traitements appliqués aux ovocytes.

10 Dans la figure 1, les ovocytes 1 sont placés sur une fente rectiligne 4, réalisée par la juxtaposition de deux plaques de verre 3 et 5, dont l'écartement est inférieur au diamètre des ovocytes. Les milieux, milieu de culture et milieu d'impulsion, arrivent dans la partie supérieure de la chambre chacun par une tubulure distincte, respectivement 10 et 11, évitant une contamination réciproque.

15 Le milieu 9 correspondant à la phase de traitement en cours arrive en continu et est évacué par une tubulure 6 située à un niveau plus bas que celui des ovocytes. Ce courant de liquide maintient par succion les ovocytes plaqués sur le fond de la chambre.

20 Sur les parois internes de la chambre se trouvent deux électrodes de platine 2 et 7, parallèles, de 1 cm de long.

L'enceinte 8 est thermostatée à 38°C.

Chaque milieu arrive dans la chambre après passage par un système retenant les bulles de gaz de taille importante.

25 Ce système est constitué d'un ballon de verre dans lequel le liquide arrive. De ce ballon part une tige d'or perforée de trous de petit diamètre : après passage à travers cette tige, les bulles de gaz de taille importante sont retenues et le liquide arrive dans la chambre par une tubulure courte.

30 Des lapines ont été superovulées par injection de FSH et de LH, et les ovocytes prélevés dans les oviductes. Après traitement 5 mn par la hyaluronidase, les ovocytes sont placés dans la chambre d'activation, dans le milieu B2 (Menezo, 1976 - C. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris 282, 1967-1970) à 38°C, dans une atmosphère à 5 % de CO_2 .

Les ovocytes peuvent immédiatement être soumis au traitement d'activation, aucune période de vieillissement n'est nécessaire.

Ils sont soumis pendant 90 minutes à une série d'impulsions de champ électrique, à un rythme d'une impulsion toutes les 4 minutes, soit 22 impulsions de durée décroissante dissipant une énergie totale 1250 µjoules, d'une durée totale de 14 868 µs, le champ électrique a une valeur de 1,8
5 Kv. cm⁻¹.

Avant chaque impulsion, le milieu de culture est remplacé par un milieu d'impulsion constitué d'une solution isotonique de glucose contenant CaCl₂ 10µM.

A la fin du traitement d'activation, tous les ovocytes ont deux
10 globules polaires bien formés. On obtient donc au même moment, à quelques minutes près, une population homogène d'ovocytes activés dans le même état physiologique. Cela présente deux atouts : le premier est de pouvoir toujours réaliser les greffes de noyau dans des oeufs physiologiquement identiques, le second, plus pratique, est de pouvoir opérer au
15 moment où les chromosomes (haploïdes) se trouvent tous en fin de télophase juste sous le deuxième globule polaire. Ce repérage naturel de l'endroit où se trouvent les chromosomes facilite leur retrait en "aveugle" et permet, sans avoir recours à des techniques de marquage fluorescent, d'enchaîner rapidement les étapes de manipulations.

On peut alors effectuer le prélèvement des chromosomes. On remarque que les deux globules polaires ne sont pas toujours accolés (certains sont à l'opposé l'un de l'autre, c'est pourquoi le premier globule polaire n'est pas un bon marqueur de l'endroit où se trouvent les chromosomes maternels). L'efficacité de cette opération, vérifiée par la présence
25 ultérieure d'un pronucleus, est supérieure à 80 %. Un blastomère est ensuite introduit sous la zone pellucide. Quinze à 20 ovocytes peuvent être manipulés en 1 heure.

On procède ensuite à la fusion cellulaire. La méthode de fusion cellulaire dérive des travaux de Zimmerman sur les champs électriques. La procédure a été affinée. (Ozil et Modlinski 1986, J. Embryol. Exp. Morph. 96, 211-228).

On obtient 100 % de fusion. Il sera possible de réaliser automatiquement, sous le contrôle d'un logiciel, l'alignement et la fusion cellulaire dans la chambre de stimulation. Cette procédure permettra de limiter la durée des manipulations et de standardiser les conditions expérimentales.

MATERIELS ET METHODES

On a induit une superovulation chez les femelles de lapin sexuellement matures d'espèces variées par injection sous-cutanée 5 d'hormone stimulant le follicule (FSH) et d'hormone lutéinisante (LH) en accord avec la technique décrite par Kennely et Foote (1965) et modifiée par Thibault (communication personnelle). Les femelles ont reçu 2 mg de FSH en cinq injections à 12 heures d'intervalle : 0,250, 0,250, 0,650, 0,650 et 0,250 mg. 12 heures plus tard, avant la saillie par un mâle vasectomisé, 10 on leur a injecté 0,33 mg de LH.

Les ovocytes ont été récupérés à partir des oviductes 12-15 h après la saillie par lavage par une solution saline de phosphate tamponné (PBS). Ils ont été incubés pendant 5 minutes dans l'hyaluronidase (300 i.u.ml⁻¹ dans du PBS) pour éliminer les cellules folliculaires. Après le 15 traitement, les ovocytes ont été cultivés à 38° dans du milieu B2 (Ménézo 1976) dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

Méthode et procédure expérimentale

20 La perméabilité membranaire des ovocytes de lapin fraîchement ovulés a été transitoirement augmentée par ouverture des pores par une impulsion induite par un champ électrique en présence de Ca²⁺ 10 μM contenu dans une solution de glucose 0,3 M - 18 MΩm H₂O (milieu d'impulsion). Il est admis que, pendant que les pores sont ouverts, un flux 25 d'ions circule selon les gradients de concentration à travers la membrane cellulaire vers l'intérieur du cytosol comme cela a déjà été montré dans des ovocytes d'oursin (Rossignol et al, 1983). Ainsi, l'influx ionique peut être ajusté dans ces conditions soit par la différence de concentration ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule soit par la durée des impulsions.

30 La procédure expérimentale pour un flux ionique induit électriquement était similaire à celle précédemment décrite pour la fusion par champ électrique d'embryons de lapin à deux cellules (Ozil et Modlinski 1986). Les ovocytes sont cultivés avec du milieu M16 (Whittingham, 1971) à 38°C dans une chambre spécialement conçue. Avant chaque impulsion, le

milieu de culture est automatiquement remplacé par le milieu d'impulsion. Les détails de la chambre sont décrits dans la figure 1. Chaque impulsion était composée de deux impulsions alternatives afin d'éviter " une électrophorèse latérale " (Jaffe 1977) des protéines de membrane qui 5 pourrait intervenir après plusieurs impulsions de la même polarité (Poo, 1981). L'amplitude du signal ionique était modulé à travers la durée de l'impulsion. Le processus en entier était contrôlé par un micro-ordinateur IBM PC-AT 286 par l'intermédiaire d'une interface Tektronix MI 5010 avec un programme écrit en MS-BASIC. Le voltage réel et le courant entre les 10 électrodes étaient mesurés par un oscilloscope Tektronix 77041 monté avec un convertisseur numérique programmable 7D20 et un amplificateur 7A22.

Le rythme des impulsions électriques et la durée totale du traitement étaient les mêmes pour tous les traitements, c'est-à-dire appliquer une impulsion toutes les quatres minutes pendant 90 minutes. 15 Ces valeurs ont été choisies parce qu'elles s'accordent bien avec la fréquence et la durée moyenne de l'hyperpolarisation du potentiel de membrane des ovocytes de lapin pendant la fécondation (22 oscillations biphasiques du potentiel membranaire pendant les premières 90 minutes suivant la fusion sperme-oeuf, une impulsion toutes les 4 minutes -McCulloh 20 et al., 1983). On sait que la variation du potentiel de membrane reflète le passage de K basé sur des canaux activés par le calcium et qu'elles constituent donc un indicateur fiable de $[Ca^{2+}]_i$ (Miyazaki et Igusa 1982). L'amplitude de champs électriques (1.8 kVcm⁻¹) était constante pour tous les groupes expérimentaux.

25

Traitements des ovocytes

Les effets des différents paramètres du traitement sur l'activation des ovocytes ont été étudiés dans quatre groupes expérimentaux. 30

Groupe A - Environnement expérimental

Afin de tester l'effet des conditions expérimentales (perfusion continue, remplacement du milieu de culture et impulsions électriques), des ovocytes fraîchement ovulés et des œufs fécondés soumis à 22 doubles impulsions de 900 µs dans le milieu d'impulsion dépourvu de Ca²⁺ (la première impulsion est donnée 13 à 15 heures après la saillie). Après le traitement, les œufs fécondés ont été transférés dans des receveuses pour déterminer la survie à terme. Les ovocytes non fécondés ont été cultivés in vitro et le taux d'activation parthénogénétique a été noté.

Groupe B - ions calcium et durée des impulsions

L'effet de la durée des impulsions a été étudié dans le milieu d'impulsion contenant du CaCl₂ 10 µM. Le traitement pour lequel les ovocytes ne sont pas activés a été considéré comme étant la durée minimum et celui résultant dans la lyse des ovocytes a été considéré comme étant la durée maximum. Un jeu de six traitements avec 22 doubles impulsions constantes a été choisi arbitrairement. Ces traitements ont une durée d'impulsions égale à 200, 300, 600, 900, 1200 et 1500 µs respectivement. L'effet de la présence d'ions Na⁺ et Mg²⁺ à une concentration de 10 µM dans le milieu d'impulsion a été testé avec 22 doubles impulsions constantes d'une durée de 900 µs.

Groupe C - modulation des impulsions et type d'activation parthénogénétique

Le traitement avec 22 doubles impulsions de durée constante révèle la valeur de la durée de l'impulsion pour laquelle les effets maximum et minimum sont enregistrés. Ces traitements constants ne produisent pas un taux élevé d'activation avec un type uniforme d'œufs parthénogénétiques. Afin de vérifier si une réduction progressive des

stimuli calcium dans un traitement donné a un effet sur le type de réaction parthénogénétique, les ovocytes ont été soumis à des traitements dans lesquels la durée des impulsions décroissait peu à peu selon une relation exponentielle négative. Quatre traitements ont été testés en accord avec la 5 durée maximum de la première impulsion. La figure 2 donne la courbe des durées d'impulsions pour ces traitements.

Une relation exponentielle négative ($D(n)=e^{(axn+b)+c}$) entre l'indice de l'impulsion (I à 22) et la durée d'impulsion (1500 μ s à 200 μ s) a été choisie arbitrairement pour trouver la valeur de chaque impulsion au 10 cours du traitement.

Avec $D(n)$: durée d'impulsion du cycle (n).

Le coefficient a détermine la pente de décroissance de cette relation.

Le coefficient b détermine la durée de la première impulsion.

15 Le coefficient c détermine la durée de la dernière impulsion.

Les coefficients a et c sont constants et égaux respectivement à -0,4 et 200.

b = 5,9920 pour le traitement I

= 6,5519 pour le traitement II

20 = 6,9080 pour le traitement III

= 7,1750 pour le traitement IV.

Groupe D - Modulation du champ électrique et développement in vitro

25 Les oeufs sont traités en présence de 8 μ g/ml-1 de cytochlasine B dans le milieu de culture pour bloquer l'expulsion du second globule polaire et obtenir une population uniforme d'oeufs parthénogénétiques diploïdes. Deux traitements ont été appliqués au groupe C, le traitement I qui est le traitement faible avec une durée totale d'impulsion égale à 11 228 μ s et le traitement III qui est le traitement fort avec une 30 durée de 14 868 μ s. Les oeufs parthénogénétiques ont été cultivés in vitro jusqu'au stade blastocyste et l'influence des deux traitements a été évalué par le taux de formation de blastocyste.

Viabilité au delà de l'implantation des embryons parthénogénétiques

diploïdes

5 Les embryons au stade 4-cellules ont été transplantés dans les oviductes de receveuses. Les oeufs fécondés ont également été transplantés dans la corne opposée de quelques receveuses afin de comparer le développement parthénogénétique au développement normal. Les receveuses ont été autopsierées entre le jour 8.5 et le jour 13 de la gestation et le
10 nombre de sites d'implantation de foetus vivants a été noté.

RESULTATS

Groupe A - Effet de l'environnement expérimental (contrôles)

15 Quant le milieu d'impulsion ne contient pas d'électrolytes, aucun des ovocytes (105) n'est activé. L'environnement expérimental et les conditions de culture c'est-à-dire le remplacement du milieu de culture avant chaque impulsion par un milieu d'impulsion ne contenant pas d'électrolytes et le traitement par des impulsions électriques relativement fortes ($2 \times 1.8 \text{ kVcm}^{-1} \times 900\mu\text{s} \times 22$ fois, c'est-à-dire une durée totale d'impulsions de 30 600 μs) n'a pas d'effet visible sur les ovocytes fraîchement ovulés mais les conditions ne permettent pas de déclencher le développement. Par contre 41 % (9/22) des oeufs fécondés traités de la
20 même manière se sont développés à terme démontrant ainsi que le traitement par des impulsions électriques de haut voltage n'a pas d'effet contraire sur la capacité de développement des ovocytes fécondés. Il n'était pas possible de remplacer totalement le milieu de culture par le milieu d'impulsion avant chaque impulsion. Le courant mesuré pendant l'impulsion révèle que la conductivité du milieu d'impulsion est au moins de 15 %
25 supérieure à celle du milieu d'impulsions mesurée entre les électrodes avant expérience et avant la première injection de milieu de culture. Pendant l'expérimentation, des ions provenant du milieu de culture sont encore présents pendant les impulsions et ceci modifie le signal ionique. Ces variations du micro-environnement n'apparaissent pas comme ayant un quelconque effet significatif sur l'activation ou le développement
30 embryonnaire. Dans cette série d'expérimentations, les oeufs sont lavés par

le milieu d'impulsion pendant 45 secondes toutes les quatre minutes. Cette période pendant laquelle les oeufs ne sont pas dans le milieu de culture n'a pas d'effet significatif sur l'activation ou sur la survie à terme.

5 Groupe B - ions calcium et durée de l'impulsion

Le tableau I résume les résultats de l'expérimentation dans lequel le taux d'activation a été testé en relation avec la durée d'impulsion en présence de CaCl_2 10 μM .

10 L'apparition de pronuclei après 3 ou 4 heures de culture sert de marqueur pour l'activation parthénogénétique. Ces résultats montrent clairement que l'activation parthénogénétique est déclenchée quand le milieu d'impulsion contient Ca^{2+} 10 μM .

15 De plus, le taux d'activation est directement relié à la durée de l'impulsion qui contrôle indirectement la stimulation par le calcium. La durée des stimuli ioniques n'influence pas seulement le taux d'activation mais aussi la configuration nucléaire des ovocytes parthénogénétiquement activés d'âge postovulatoire semblables.

20 Plus la durée d'impulsion est longue, plus la proportion d'oeufs activés est élevée mais plus la proportion d'ovocytes contenant des micronuclei est importante.

Groupe C - modulation des impulsions et type d'activation parthénogénétique.

25 Les résultats sont résumés dans le tableau II. La relation entre le type d'activation parthénogénétique et chaque traitement est également montrée dans le tableau III. Quand la durée de l'impulsion est réduite, tous les ovocytes sont activés et la majorité (91 %) d'entre eux ont un pronucleus unique et deux globules polaires quand la méiose est terminée.

30 Ainsi, la modulation des stimuli de calcium à travers la durée de l'impulsion semble être effective et influence les premières étapes du développement.

Dans cette étude, l'âge des ovocytes était similaire et ne peut donc pas affecter les résultats.

Groupe D - Effet de la modulation de champ électrique sur le
5 développement in vitro d'ovocytes activés par parthénogénèse.

Les résultats sont résumés dans le tableau III. Aucune différence visible dans le développement de chaque groupe n'a pu être notée jusqu'à la troisième division.

10 Dans les embryons parthénogénétiques produits par le traitement I, une proportion plus faible d'embryons présente une compaction et ceux qui se compactent sont irréguliers. Par contre, la majorité des embryons produits par le traitement III se compacte et se développe jusqu'au stade de blastocyste.

15 Ces résultats montrent que la forme du stimulus d'activation a un effet profond sur la capacité des embryons parthénogénétiques à se développer jusqu'au stade de blastocyste in vitro.

Viabilité post-implantation des oeufs parthénogénétiques diploïdes.
20

13 receveuses sont devenues gravides et ont été autopsierées entre le jour 8.5 et le jour 13. Les résultats sont résumés dans le tableau IV. Bien que les embryons parthénogénétiques soient plus petits que les embryons de contrôle, ils apparaissent morphologiquement normaux selon 25 les critères définis pour le lapin par Edwards (1968). Le rapport entre la taille des annexes embryonnaires et celle du foetus est grossièrement équivalent pour les embryons obtenus par fécondation ou par parthénogénèse.

Ainsi, il semble que le développement général des embryons 30 parthénogénétiques, le foetus et ses tissus trophoblastiques soit ralenti.

Les foetus morts ont plusieurs anomalies et il n'était pas possible de les classifier.

Tableau 1 -

Effet de la présence d'ions calcium et durée de l'impulsion électrique sur l'activation des ovocytes de lapin

5

	Durée d'impulsion (μs)	Nombre d'ovocytes	Nombre lysés (%)	% activés	% d'ovocytes activés avec 1 PN+PB1 &PB2	2PN +PB1	2PN# +PB1
10	200 μs	47	0 (0)	13	83	17	0
	300 μs	99	0 (0)	62	68	25	7
	600μs	85	0 (0)	98	71	19	10
	900 μs	63	0 (0)	100	62	14	24
	1 200 μs	97	5 (5)	100	57	29	14
	1 500 μs	50	3 (6)	100	30	17	53

20

Tableau 2 - Effet de la modulation du champ électrique sur l'activation

25

	<u>Traitemen</u> t	<u>Nombre</u> <u>d'ovocytes</u>	<u>%</u> <u>activation</u>	% ovocytes activés avec		
				1 PN+PB1 &PB2	2PN +PB1	2PN# +PB1
	I	86	88	83	9	8
	II	151	99	89	9	1
	III	118	100	91	9	0
	IV	96	100	70	25	5

30

Pronuclei anormaux, petits micronuclei

Tableau 3 -

Effet de la modulation de champ électrique sur le développement d'oeufs parthénogénétiques *in vitro*

	<u>Traitemen</u>	<u>Nombre</u>	<u>%</u>	<u>Nombre</u>	<u>Nombre</u>	<u>Nombre</u>
		<u>d'ovocytes</u>	<u>activation</u>	<u>cultivés</u>	<u>morulae</u>	<u>blastocystes</u>
					<u>compact (%)</u>	<u>(%)</u>
5	I	98	91	69	25(36)	23 (33)
10	III	352	100	244	244(100)	216 (88)

Tableau 4 -

15 Développement post-implantation d'oeufs parthénogénétiques soumis au traitement III.

	<u>Jour de l'autopsie</u>	J 8-9	J 9-10	J 10-11	J 12-13	Total
20	<u>Nombre d'oeufs transférés</u>	21	26	50	68	165
	<u>Nombre d'implantations</u>	9	3	15	23	50
25	<u>% cumulé</u>	(42,8)	(21,2)	(27,8)	(30,3)	
	<u>Nombre de foetus vivants</u>	8	3	7	0	18
	<u>% cumulé</u>	(88,8)	(91,6)	(66,6)	(36)	

REFERENCES

- Basset, C.A. and Hermann, I. (1968). The effect of electrostatic fields on macromolecular synthesis by fibroblast in vitro. *J. Cell Biol.* 39,9A.
- 5 Cuthbertson, K.S.R. Whittingham, D.G. & Cobbold, P.H. (1981). Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 294, 754-757.
- 10 Cuthbertson, K.S.R. & Cobbold, P.H. (1985). Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} , *Nature* 316, 541-542.
- 15 Cuthbertson, K.S.R. (1983). Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *J. Exp. Zool.* 226, 311-314.
- Edwards, A.J. (1968). The external development of the rabbit and rat embryo. *Advances in teratology* 3, 239-263.
- 20 Igusa.Y. & Miyazaki, S.I. (1983). Effect of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J. Physiol.* 340 611-632.
- 25 Igusa.Y. & Miyazaki. S.I. (1986) Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium-sensitive electrodes. *J. Physiol.* 377, 193-205.
- Jaffe, F.L. (1977). Electrophoresis along cell membranes. *Nature* 265,600-602.
- 30 Kaufman, M.H., Barton, S.C. & Surani, M.A.H. (1977). Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265, 53-55.
- Kaufman, M.H. (1983). Early mammalian development : parthenogenetic studies. Cambridge University Press.

- Kennelly, J.J. & Foote, R.H. (1965). Superovulatory response of pre- and post-puberal rabbits to commercially available gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.* 9, 177-188.
- 5 Mann, J.R. & Lovell-badge, R. (1986). Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature* 310, 66-67.
- 10 McCulloh, D.H., Rexroad. C.E. Jr & Levitan H. (1983). Insemination of rabbit egg is associated with slow depolarization and repetitive diphasic membrane potentials. *Devi. Biol.* 95 372-377.
- McGrath, J. & Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179-163.
- 15 Ménézo.Y. (1976). Mise au point d'un milieu artificiel défini pour la survie et la maturation des gamètes et pour la culture de l'oeuf fécondé. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, 282, 1967-1970.
- 20 Miyazaki, S.I. Igusa, Y. (1982). Ca-mediated activation of a K current at fertilization of golden hamster eggs.
Proc. natn. Acad. Sci. USA. 79, 931-935.
- 25 Miyazaki, S.I. Hashimoto, N. Yoshimoto, Y. Kishimoto, T., Igusa, Y., & Miramoto, Y. (1986). Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Devl. Biol.* 118, 259-267.
- 30 Miyazaki, S.I. (1988). Inositol 1,4,5. Triphosphate-induced calcium release and nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell. Biol.* 106, 345-353.
- Ozil J.P. & Modlinsky, J. (1986). Effects of electric field on fusion and survival of 2-cell rabbit embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 96, 211-228.

- Rodan, G.A., Bourret, L.A. & Norton, L.A. (1978). DNA Synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. *Science* 199, 690-692.
- 5 Rossignol, D.P., Decker, G.L, Lennarz, W.J., Isong, T.Y., & Teissié, J. (1983). Induction of calcium-dependant, localized cortical granule breakdown in sea-urchin eggs by voltage pulsation *Biochim. biophys. Acta* 763, 346-355.
- 10 Smith, L.C. & Wilmut, I. (1989). Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the developement in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40, 1027-1035.
- Stice S.L. & Robl. J.M. (1988). Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. reprod.* 39, 657-664.
- 15 Surani, M.A.H. & Barton, S.C. (1983). Developement of gynogenetic eggs in the mouse. Implication for parthenogenetic embryos. *Science* 222, 1034-1036.
- 20 Surani, M.A.H., Barton S.C. & Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548-550.
- 25 Swann, K., Igusa, Y. & Myayazaki, S.I. (1989). Evidence for an inhibitory effect of proteine kinase C on G-protein-mediated repetitive calcium transients in hamster eggs. *The EMBO journal* vol. 8, N°12 in press.
- Ware, C.B., Barnes, F.L., Maiki-Laurila, M., & First, N.L. (1989). Age dependance of bovine oocyte activation. *Gamète. res.* 22, 265-275.

25

Whittingham, D.G. (1971). Culture of mouse Ova. J. reprod. Fert. Suppl. 14, 7-21.

5 Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 320, 63-65.

Zimmermann, U. (1982). Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta. 694 227-277.

10

15

20

25

30

REVENDICATIONS

1. Dispositif de culture de cellules constitué d'une enceinte comportant une arrivée de fluide et une sortie de fluide, caractérisée en ce qu'à la partie inférieure de l'enceinte, se trouvent un ou plusieurs orifices dont la géométrie est telle qu'elle s'oppose au passage des cellules et en ce que le fluide entrant dans l'enceinte est prélevé, au moins en partie, à travers les orifices, en créant une dépression telle qu'elle assure sensiblement le blocage des cellules sur le ou les orifices, une partie du fluide étant évacuée par débordement.
5
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que des électrodes sont placées sur la paroi interne de l'enceinte.
3. Dispositif selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'enceinte comporte deux parois latérales sur lesquelles sont placés les
10 électrodes, le ou les orifices étant alignés à égale distance des électrodes.
4. Dispositif selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'orifice est une orifice unique, constitué par une fente rectiligne dont la largeur est inférieure au diamètre des cellules.
5. Dispositif selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce
20 que la fente est créée par la juxtaposition de deux plaques de verre.
6. Dispositif selon les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'enceinte peut être isolée et placée dans une atmosphère de composition définie et/ou stérile.
7. Dispositif selon les revendications 1 à 6, caractérisé en ce
25 que les arrivées et les sorties de fluide sont gérées par un système électronique.
8. Dispositif selon les revendications 2 à 7, caractérisé en ce que la fréquence, la durée et l'intensité des impulsions électriques arrivant dans les électrodes sont gérées par un système électronique.
9. Dispositif selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce
30 que le fluide arrive dans l'enceinte par une tubulure courte, après passage par un système évitant l'arrivée de bulles de gaz de taille importante.

10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que le système est constitué d'un ballon de verre dans lequel arrive le fluide et d'une tuyauterie d'évacuation qui est constituée d'un tube perforé de trous de très petit diamètre qui débouchent au voisinage du centre du ballon,
5 ladite tuyauterie se raccordant sur la tubulure courte.

11. Dispositif selon les revendications 1 à 10, caractérisé en ce que des fluides de compositions différentes peuvent arriver successivement dans l'enceinte, et que les systèmes d'arrivée et d'extraction des fluides évitent leur contamination réciproque.

10 12. Dispositif selon les revendications 2 à 11, caractérisé en ce que :

- le fluide présent dans l'enceinte est un milieu d'impulsion, contenant au moins une substance assurant l'apparition d'un champ électrique et éventuellement une molécule ou toute substance spécifique que l'on veut faire pénétrer dans la cellule, et
- 15 - une impulsion de champ électrique est appliquée par l'intermédiaire des électrodes.

20 13. Dispositif selon les revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le système électrique permet de réaliser sur les cellules la séquence comprenant les étapes suivantes :

- mise en culture des cellules dans un milieu de culture approprié pendant un temps déterminé,
- remplacement du milieu de culture par un milieu d'impulsion,
- envoi d'une impulsion de champ électrique par l'intermédiaire des
25 électrodes,
- remplacement du milieu d'impulsion par un milieu de culture.

14. Dispositif selon les revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les cellules traitées sont des ovocytes.

30 15. Dispositif selon les revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les cellules traitées sont des oeufs fécondés.

16. Dispositif selon les revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le milieu d'impulsion contient Ca^{2+} .

17. Dispositif selon les revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le milieu d'impulsion contient Ca^{2+} à une concentration 10 μM .

18. Dispositif selon les revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la séquence à laquelle sont soumises les cellules est répétée 5 plusieurs fois, avec une fréquence pouvant varier, la durée de l'impulsion de champ électrique pouvant être différente au cours de chaque séquence.

19. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il permet de réaliser l'alignement des cellules et la fusion cellulaire par action d'une impulsion calibrée générée par un champ électrique.

10 20. Dispositif selon la revendication 19, caractérisé en ce que le traitement de fusion cellulaire est automatiquement géré par un système électronique.

15

20

25

30

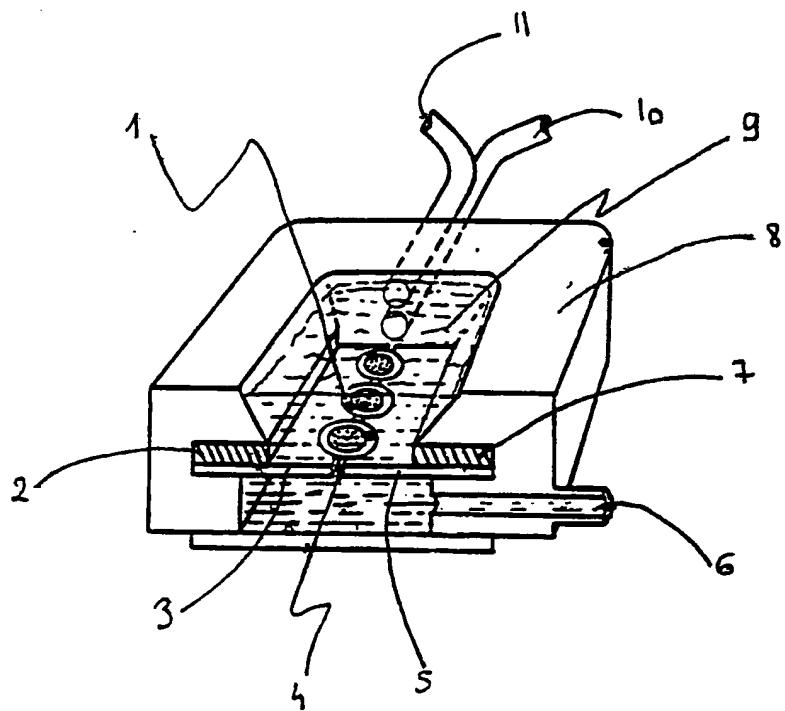


Figure 1

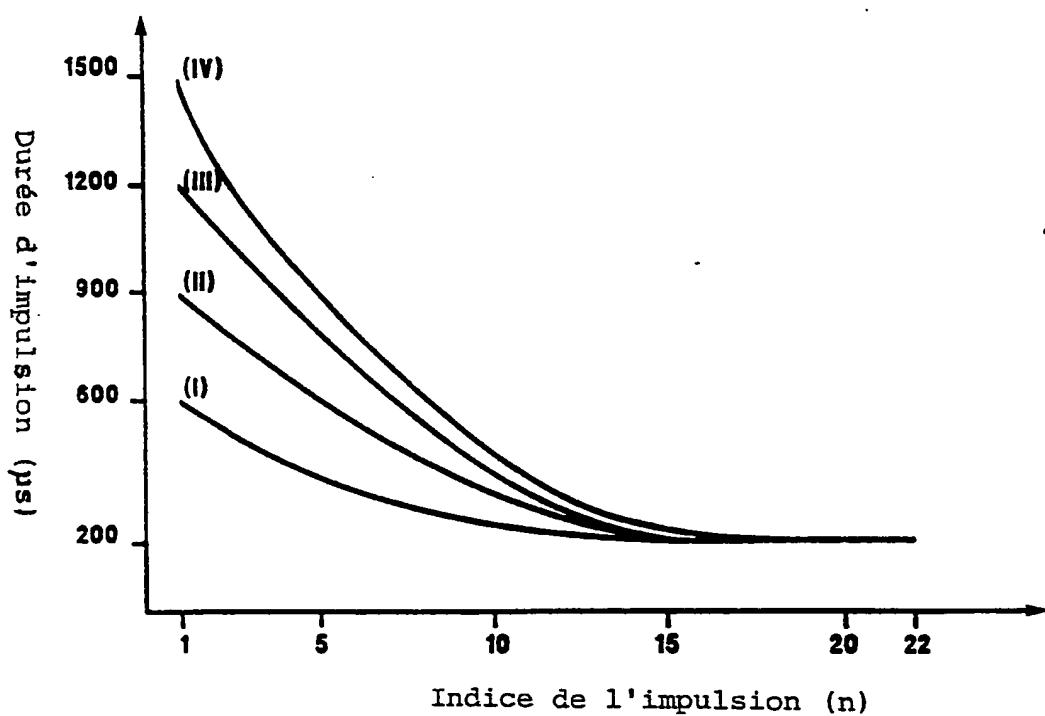


FIGURE 2

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2659347

N° d'enregistrement
nationalFR 9003108
FA 442051

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie		
X	US-A-4 894 343 (S. TANAKA et al.) * Fig.; revendications * ---	1, 4, 5
X	DE-A-3 829 028 (HITACHI LTD) * Fig. * ---	1, 4, 5
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 13, no. 487 (C-649)[3835], 6 novembre 1989; & JP-A-1 191 676 (HITACHI LTD) 01-08-1989 * Résumé * ---	1-20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 13, no. 24 (C-561)[3372], 19 janvier 1989; & JP-A-63 230 070 (SHIMADZU CORP.) 26-09-1988 * Résumé * ---	1-20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 13, no. 402 (C-633)[3750], 6 septembre 1989; & JP-A-1 144 968 (HITACHI LTD) 07-06-1989 * Résumé * ---	1-20
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 13, no. 84 (C-572)[3432], 27 février 1989; & JP-A-63 269 977 (HITACHI LTD) 08-11-1988 * Résumé * -----	1-20
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C 12 M C 12 N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
14-12-1990		COUCKE A.O.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		